

学校编码：10384

学号：200426123

分类号__密级__

UDC__

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

大肠杆菌 EF-Tu 多蛋白复合体的研究

Research of EF-Tu multiple protein complex

in *Escherichia coli*

肖昆

指导教师姓名：彭 宣 宪 教授

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2007 年 06 月 29 日

论文答辩时间：2007 年 08 月 06 日

学位授予日期：2007 年

答辩委员会主席：李祺福 教授博导

评阅人：杨增明 教授博导

刘润忠 副教授

2007 年 08 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1.保密(),在年解密后适用本授权书。

2.不保密()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

目 录

摘 要	I
Abstract.....	II
1. 前言	1
1.1 革兰氏阴性病原菌的危害性	1
1.2 病原菌与宿主	2
1.3 外膜蛋白在病原发生中的作用	6
1.4 蛋白质相互作用	7
1.4.1 生物物理学方法	8
1.4.2 分子生物学方法	10
1.4.3 遗传学方法	12
1.4.4 预测蛋白质间相互作用的生物信息学方法	13
2. 材料与方法	14
2.1 材料	14
2.2 试验方法	18
3. 结果	26
3.1 大肠杆菌 K12 中 EF-Tu 多蛋白复合物的发现	26
3.1.1 EF-Tu 多蛋白复合物的发现	26
3.1.2 Western blotting 对发现的蛋白复合物的确认	27
3.1.3 Far-Western blotting 对发现的蛋白复合物的进一步证明	29
3.1.4 免疫共沉淀对该蛋白复合物的再次确认	31
3.2 EF-Tu 多蛋白复合物中各蛋白在 EFTu 跨膜运动中的作用.....	32
3.2.1 EF-Tu 蛋白复合物中各蛋白在浆蛋白组分中的作用研究	32
3.2.2 EF-Tu 蛋白复合物中各蛋白在膜蛋白组分中的作用研究	38
3.2.3 EF-Tu 蛋白复合物中各蛋白在分泌性蛋白组分中的作用研究	44
3.3 EF-Tu 蛋白复合物与人单核/巨噬细胞作用的研究	50
3.3.1 EF-Tu 多蛋白复合物中各蛋白组分与人单核/巨噬细胞作用的研究	50

3.3.2 不同大肠杆菌菌株分泌性蛋白与人单核/巨噬细胞作用的研究	51
4. 讨论	54
5. 小结	58
6. 展望	58
参考文献	59
攻读硕士期间发表的论文和成果	67
致谢.....	68

Catalog

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
1. Foreword.....	1
1.1 Damage of Gram negative pathogen.....	1
1.2 Pathogen and host.....	2
1.3 Outer membrane protein in pathogenic mechanism	6
1.4 Study on interaction between protein-protein.....	7
1.4.1 Biophysical methods.....	8
1.4.2 Molecular biology methods	10
1.4.3 Genetic methods	12
1.4.4 Bioinformatical methods for predict interaction between protein-protein	13
2. Materials and methods.....	14
2.1 Materials	14
2.2 Methods.....	18
3. Results	26
3.1 EF-Tu multiple protein complex in <i>Escherichia coli</i>	26
3.1.1 Determinate EF-Tu multiple protein complex.....	26
3.1.2 Confirming by Western blotting	27
3.1.3 Confirming by Far-Western blotting.....	29
3.1.4 Confirming by CO-IP	31
3.2 Function of EF-Tu multiple protein complex in the process of EF-Tu moved from cytoplasm to the environment	32
3.2.1 Study on EF-Tu multiple protein complex in cytoplasm.....	32
3.2.2 Study on EF-Tu multiple protein complex on membrane.....	38
3.2.3 Study on EF-Tu multiple protein complex in secretome	44
3.3 Interaction between EF-Tu multiple protein complex and THP-1, human	

monocytic/macrophage cell lines	50
3.3.1 Study on interaction between EF-Tu multiple protein complex components and THP-1 cell.....	50
3.3.2 Study on interaction between diverse secretome and THP-1 cell	51
4. Discussion	54
5. Conclusion	58
6. Expectation	58
References.....	59
Published paper and patent	67
Acknowledgement.....	68

摘要

细菌延伸因子 Tu (elongation factor Tu, EF-Tu) 是一种高丰度蛋白, 在蛋白质生物合成的延伸过程中起到了关键性的作用。近年来, EF-Tu 却是作为一种新发现的病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 分子而受到高度重视。作为一个具有高度保守性的菌细胞内的蛋白质, 它是如何从细胞内跨膜运动到细胞外, 并且被宿主细胞特异性地识别进而引发宿主的免疫反应的。同时, 在此过程中又有哪些膜蛋白起了重要的作用。这无疑具有着相当重要的生物学意义。

试验首先采用 Ni-NTA 柱纯化和生物质谱技术, 以模式大肠杆菌为试验材料, 发现了内膜蛋白 MdtE、外膜蛋白 OmpF 和具有 4 个跨膜片段的外膜蛋白 OmpA 与浆蛋白 EF-Tu 之间存在着蛋白质相互作用, 形成了 1 个多蛋白复合体, 被命名为 EF-Tu 多蛋白复合体。同时采用 Western blotting、Far-Western blotting 和免疫共沉淀等技术, 充分证实了上述结论。并提出了该多蛋白质复合体的分子结构模型。在此基础上, 研究这 4 种蛋白在胞浆中的结合情况。结果发现, 他们以 EF-Tu • OmpA, OmpF • OmpA 和 MdtE • OmpA 3 种两两结合的形式存在。进一步探讨该复合体在细胞分泌性蛋白中的状态, 发现该多蛋白质复合体缺少了 MdtE, 而以 EF-Tu、OmpA 和 OmpF 蛋白复合体形式分泌至胞外。最后, 对 EF-Tu 多蛋白复合体与人单核/巨噬细胞结合情况进行了研究, 发现 EF-Tu、OmpA 和 OmpF 仍然以一个多蛋白复合体的形式和细胞发生了相互作用, 其中 EF-Tu 和 OmpA 为直接结合分子。这些结果提示 OmpA 和 OmpF 在 EF-Tu 被宿主细胞识别和引起免疫反应的过程中发挥了重要作用。

上述研究首次发现了 EF-Tu 多蛋白复合体, 揭示了该复合体从胞浆至胞外的形成和运输特征, 阐明了其与动物细胞作用形式。这些研究结果对深入了解 EF-Tu 病原相关分子模式的生物学功能具有重要作用。

关键词: EF-Tu; 多蛋白复合物、OmpA、OmpF、MdtE

Abstract

Elongation factor Tu (EF-Tu), one of the most abundant proteins in *Escherichia coli*, is a guanine nucleotide-binding protein that plays a key role in protein synthesis. It is highly conserved in all bacteria and located in cytoplasm. Recently, it has been reported as a new pathogen-associated molecular pattern (PAMP) molecule in *Arabidopsis* plants. However, information regarding to how the protein moved from cytoplasm to the environment and recognized by host cells is not available. .

With the use of Ni-NTA and Mass spectrum methods, a multiple protein complex, named EF-Tu multiple protein complex, was determinate. This complex consisted of OmpA, OmpF, MdtE, and EF-Tu in cell membrane, respectively, being a multi-pass membrane protein with four out membrane domains, an outer membrane protein; an inner membrane protein and a soluble protein in *Escherichia coli*. Furthermore, the result was confirmed by Western blotting, Far-western blotting and CO-IP, indicating the full structure of EF-Tu multiple protein complex. Furthermore, three forms of protein-protein interactions, EF-Tu·OmpA , OmpF·OmpA and MdtE·OmpA, were characterized in cytoplasm for this multi-component complex. In secretome, this complex included OmpA, OmpF and EF-Tu, suggesting that MdtE was not accompanied with the other three proteins out of the cell. Importantly, the EF-Tu multiple protein complex in secretome was the components bound with human monocytic/macrophage cells, in which OmpA and EF-Tu could directly interacted with the host cells. This indicates that OmpA and OmpF play an important role in reorganization of EF-Tu by host cells and their further immune responses.

In summary, EF-Tu multiple proteins complex was reported for the first time in present study. Furthermore, the diverse structures and functions of this complex associated with its locations of cytoplasm, cell membrane and secretive proteins were characterized. Our findings highlight the mechanism of EF-Tu out of the cells and are helpful in an understanding of EFTu-PAMPs

Keywords: EF-Tu, multiple proteins complex, OmpA, OmpF, MdtE

1 前 言

1.1 革兰氏阴性病原菌的危害性

细菌根据革兰氏染色可以分为革兰氏阴性细菌(Gram⁻)及革兰氏阳性细菌(Gram⁺)两大类。其中,许多与人类健康和生产相关的重要病原菌都属于革兰氏阴性细菌,如能引起肠道疾病的大肠杆菌(*Escherichia coli*)及其各类型致病株、诱发伤口感染的条件致病菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、传染病霍乱的病原体霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和鼠疫的病原体鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*),引发痢疾常见的志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)等。

许多革兰氏阴性菌造成的危害性是巨大的,历史上爆发的许多大规模的全球性传染病的病原体都是革兰氏阴性菌。例如,引起烈性传染病鼠疫的病原菌鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*),其传染性强,病死率高,曾给人类造成极大的危害^[1]。历史上曾有3次世界性大流行,第1次在公元6世纪,首先发生在地中海附近地区,流行几乎遍及所有国家,持续50年,死亡1亿人口。第2次发生于14世纪,蔓延了整个欧洲,当时称之为“黑死病”,波及亚洲和非洲北部,死亡约4000万人。第3次大流行期间,流行于我国东北各省、内蒙古、沿海等地,死亡共达10万人^[2]。

又如已有180多年流行历史的烈性肠道传染病霍乱,是由霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)引起的^[3]。自1817年到1923年发生6次古典型霍乱的大流行,全世界死亡人数均超过千万。每次大流行都波及我国,第6次大流行后到1949年,每年均有流行,仅1932年据称就有2000万人感染,死亡40万人。1961年开始的埃尔托霍乱第7次世界大流行,起自印度尼西亚,后波及五大洲的100多个国家和地区,历时30多年仍未得到有效控制,给世界生命和财产造成严重损失。并且,霍乱并没有随着卫生等生活环境的改善而消失^[4],它的流行特点是爆发式的,开始在数个不同地点同时发生,迅速传播流行可累及许多国家并持续多年。1992年霍乱的第8次世界性大流行中^[5],0139霍乱弧菌引起的新型霍乱席卷印度和孟加拉国的某些地区,至1993年4月已报告十万余病人,也已波及包括我国的许多国家和地区。

其它还有由奈瑟氏脑膜炎双球菌(*Neisseria meningitidis*)引起的流行性脑脊髓膜炎,例如英国于1996年初爆发有史以来最大规模的流行性脑脊髓膜炎流行,已有死亡病例;至1997年年初以来,非洲中部已经爆发脑脊髓膜炎疫情,已有一万五千人因罹患流行性脑脊髓膜炎而丧生;整个非洲大陆今年以来传出的流行性脑脊髓膜

炎病例已经高达十四万^[6]。而二十世纪 90 年代，美国 C 群脑膜炎球菌病（SCMD）爆发越来越频繁^[7]，当地 SCMD 的发病率每年维持在大约 0.5/10 万。同样是革兰氏阴性的沙门氏菌属 *Salmonella meningitis* 也成为发展中国家的细菌性脑膜炎的最主要致病菌之一^[8]。此外，沙门氏菌属病原菌也能引发伤寒，如 1995 年，全球有 16000 万人感染了伤寒，死亡 60 万人。另外常见的痢疾杆菌志贺氏属也是革兰氏阴性病原体，其中的福氏（*Shigella flexneri*）痢疾杆菌能引发最具传染性的细菌性痢疾。全球每年有超过一亿六千四百万的志贺氏细菌性痢疾病例，一百多万的死亡人数，并且大多数来自发展中国家的儿童^[9]。

除了以上能引发传染性或流行性疾病的革兰氏阴性菌外，许多位于人体各部位与人体代谢和机能密切相关的正常菌群都属于革兰氏阴性菌，如位于肠道的大肠杆菌^[10]，皮肤和鼻咽腔的绿脓杆菌（即铜绿假单胞菌）^[11]等，但是如果其生态比例失调，以至机体某一部位的正常菌群中各细菌的比例关系发生数量和质量上的变化，就成为条件致病菌使人患病：①由于机体的防卫功能减弱，引起自身感染。例如皮肤粘膜受伤（特别是大面积烧伤）、身体受凉、过度疲劳、长期消耗性疾病等，可导致正常菌群的自身感染；②由于正常菌群寄居部位的改变，发生了定位转移，也可引起疾病。例如大肠杆菌进入腹腔或泌尿道，可引起腹膜炎、泌尿道感染^[12]。另外，革兰氏阴性细菌引起的疾病也普遍存在于其它各种生物，引发严重的疾病并导致巨大的经济损失。如大肠杆菌引起的禽类败血症、沙门氏菌引起的鸡白痢、禽伤寒、副伤寒等；在渔业中由气单胞菌、弧菌、爱德华氏菌等导致的疾病，每年都会导致上百亿的经济损失^[13-14]。

1.2 病原菌与宿主

疾病是病原微生物和宿主紧密相互作用的结果，只有深入了解病原微生物与宿主相互作用的分子机理才可能鉴定出病原微生物的所有毒力基因、全面理解病原微生物的致病机理和宿主的防御机制^[15]，进而才能设计出新型、安全和有效的诊断、治疗工具和疫苗^[16]。

免疫系统是机体在长期进化中逐步形成的一套机制复杂的防御系统，包括天然免疫和获得性免疫。天然免疫是机体抵御病原微生物感染的第 1 道防线，是机体免疫重要的组成部分，但是长期以来被认为是免疫应答的一种低等形式，不具有免疫

特异性和免疫记忆的特征。随着对免疫系统的深入认识，特别是模式识别受体的发现，意识到天然免疫并不是简单地发挥非特异吞噬、清除作用，而是涉及复杂的抗原识别机制，与获得性免疫一样能够正确区分“自己”和“非己”，并且进一步调控获得性免疫。十几年前，免疫学家 Janeway 前瞻性地提出了模式识别理论，认为机体存在模式识别受体 (Pattern recognition receptor, PRR) 特异地识别病原微生物进化中保守的抗原分子，即病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 从而有效地监测病原微生物的入侵以及诱导机体免疫应答反应^[17]。该分子模式是病原微生物共同的、高度保守的结构。现代分子生物学和遗传学理论与技术的发展，正向、反向遗传学方法的运用，加深了对 PRR-PAMP 的认识，发现了从细胞表面到细胞核的信号转导途径有 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLRs)、各种蛋白激酶家族、JAK 激酶/信号转导子 (JAK / STAT) 和核因子- κ B (NF- κ B) 等信号转导通路。其中，PAMP-TLR 跨膜信号转导占据核心地位。

Toll 样受体是一种模式识别受体，识别病原微生物进化中保守分子，如脂多糖 (LPS)、肽聚糖、酵母多糖以及病原微生物的核酸等等。脂多糖受体 TLR4 是发现的第一个 TLRs，目前已经陆续发现十余种 TLRs。TLRs 不仅在天然免疫系统中发挥重要的作用，而且还调节获得性免疫，是近年来免疫学一项重大进展。

 表 1 TLRs 的主要配体及其来源^[18, 19]

受体	配体	配体来源
TLR 1	三脂酰脂肽	细菌, 分枝杆菌
TLR 2	肽聚糖	革兰氏阳性菌
	胞壁酸	革兰氏阳性菌
	非典型的脂多糖	革兰氏阴性菌
	糖肌醇磷脂	锥形虫
	脂蛋白	分枝杆菌
	酵母多糖	真菌
	热休克蛋白 70	宿主
TLR 3	双链 RNA	病毒
	Poly I : C	合成化合物
TLR 4	LPS	革兰氏阴性菌
	紫杉醇	植物

	F 蛋白	呼吸道合胞病毒
	热休克蛋白 60	宿主
	热休克蛋白 70	宿主
	透明质酸的寡糖	宿主
	硫酸肝素的多糖成分	宿主
	纤粘连蛋白	宿主
	纤维蛋白原	宿主
TLR 5	鞭毛	细菌
TLR 6	二脂酰脂肽	支原体
	胞壁酸	革兰氏阳性菌
	酵母多糖	真菌
TLR 7	咪唑并喹啉	合成化合物
	洛索立宾	合成化合物
	单链 RNA	病毒
TLR 8	咪唑并喹啉	合成化合物
	单链 RNA	病毒
TLR 9	CpG-DNA	细菌或病毒
TLR 10	未知	未知
TLR 11(小鼠)	尿路致病菌来源蛋白	尿路致病菌
	肌动蛋白抑制蛋白	寄生虫
	profilin 样蛋白	
TLR 12(小鼠)	未知	未知
TLR 13(小鼠)	未知	未知

高等植物与病原微生物的相互作用以病原微生物接触寄主植物开始,以植物产生明显的抗病或感病反应而结束。在这一过程中,高等植物对病原物的识别及其随后的信号传导是主线,它决定了植物抗病与感病的差异。植物和病原菌之间的相互作用机理一直是植物病理学的研究重点与热点课题。它们之间的互作关系可分为非亲和性和亲和性两种^[20]。尽管植物受到各种各样病原菌的侵袭,在自然界,不亲和性即

抗病性仍相当普遍，而亲和性即感病性只是少数和例外，这主要与植物的多重防御体系有关。植物对外界病原菌的防御体系包括其自身固有的和病原菌诱导的 2 种。前者主要包括细胞壁的角质、蜡质、木质素、特殊的气孔结构、小分子抗病物质（如毒性脂肪酸、酚类化合物、类萜与类黄酮类植保素以及有关的过氧化物酶、多酚氧化酶与苯丙氨酸解氨酶等）、种子固有的抗真菌蛋白和能与真菌几丁质结合的凝集素、破坏真菌细胞透性的蛋白质和核糖体失活蛋白等。而后一类属于植物第 2 层防御体系，只有当病原菌突破植物固有的第 1 道防线时才起作用。病原菌诱导的防卫系统又可分为局部和系统的抗病反应 2 种。前者主要是指过敏反应，即当植物受非亲和性病原菌感染后，侵染部位细胞迅速死亡，使病原菌不易获取养分，同时又诱导周围细胞合成抑制病原菌生长的物质，从而限制了病原菌的增殖^[21]。在过敏反应过程中的细胞死亡，过去称为坏死，现在被认为是编程性细胞死亡^[22]。而后者是建立在前者基础之上的，又称系统获得抗性。它是指植物受病原菌侵染后局部的过敏反应会产生一类信号分子，这种信号分子能诱发整个植株防卫基因的表达，从而使植物对更多的病原菌产生抵抗作用。其特点是不出现局部抗性那样的枯斑，却能抗多种病原物引起的病害^[23]。

植物免疫应答进化所到达的最高级形式就是有一个高效防御体系能够抵御微生物病原菌的潜在攻击，而其中最主要的免疫应答被认为是病原相关分子模式引发的免疫性（PAMP-triggered immunity, PTI）并且已经可以识别微生物病原菌的很多共同特征^[23]。在该领域的研究中，Kunze等在2004年首次发现一个传统的胞内蛋白——延伸因子Tu (elongation factor Tu, EF-Tu)作为一个新的病原相关分子模式引起了拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的免疫应答。EF-Tu在细菌中是一个高度保守的蛋白，并且已知其在大肠杆菌中N末端被乙酰化，Kunze等同时还发现这乙酰化N末端的头18个氨基酸能够完全地引起拟南芥的免疫应答^[24]。2006年1月，CELL杂志发表了Chisholm等关于植物免疫应答发生的综述性文章其中阐述了EF-Tu的作用机制^[25]。同年5月，Zipfel 等在进一步的研究中找到了拟南芥中EF-Tu的受体蛋白（receptor kinase essential for EF-Tu perception, EFR），其成果也被刊登在了CELL杂志上^[26]。然而，接踵而来的问题就是微生物病原菌细胞质和细胞膜中的哪些蛋白在EF-Tu的出膜机制起了什么样的作用？它们在该病原相关分子模式中又起了什么作用以及该病原相关分子模式是否在动物中也同样存在呢？

1.3 外膜蛋白在病原发生中的作用

实验研究表明外膜蛋白在细菌的致病性方面具有重要作用^[27-36]，革兰氏阴性菌的外壁明显不同于革兰氏阳性菌的蛋白质含量较低的肽聚糖层外壁，它在细菌胞质膜(内膜)和肽聚糖的外侧还有外膜，包围整个细菌,是革兰氏阴性菌细胞壁成分中所特有的结构，主要成分有磷脂、脂多糖、外膜蛋白等（如图 1-1）。通过脂蛋白的N-端脂质锚定于外膜的外膜蛋白(outer membrane proteins, OMPs)是革兰氏阴性菌外膜的主要结构，占其全部组成的 50%左右^[37]，具有多种生物学功能，不仅在维持外膜结构，保证物质运输，作为大肠菌素、噬菌体受体以及参与F因子接合等方面具有重要作用，而且在细菌与宿主的接触过程中扮演重要的角色，是一种重要的毒力因子。

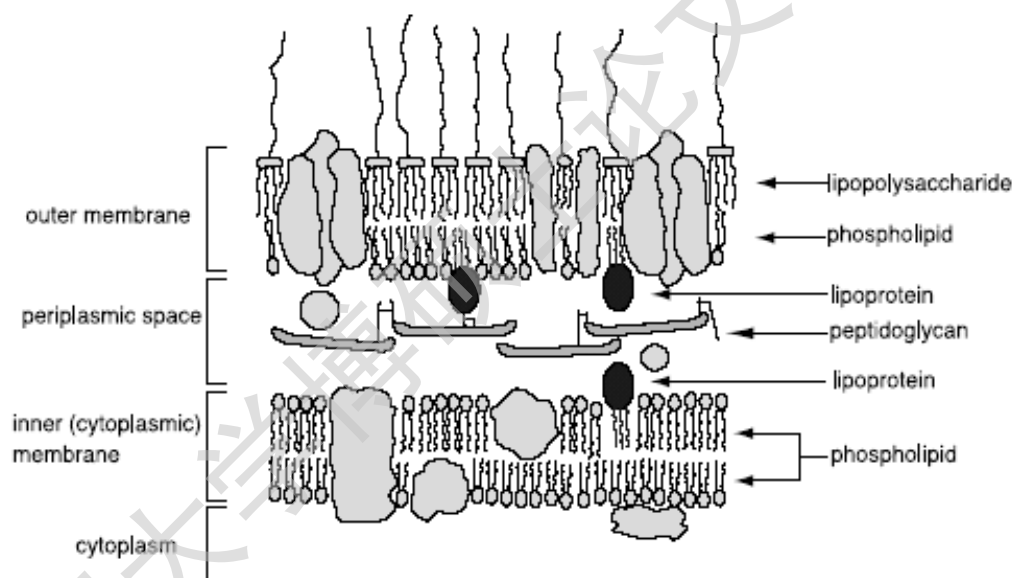


图1-1. 大肠杆菌外围结构示意图。从里到外依次为细胞质、内膜、细胞周质和外膜。外膜为不对称结构，位于细菌胞质膜(内膜)和肽聚糖的外侧，包围整个细菌,是革兰氏阴性菌细胞壁成分中所特有的结构，其主要成分有磷脂、脂多糖、外膜蛋白等，具有多种生物学功能^[38]。

Fig 1-1. Schematic representation of the *E. coli* envelope structure. Note that the outer membrane is an asymmetrical bilayer containing LPS in the outer leaflet and phospholipids in the inner leaflet^[38].

OMPs参与了菌体的多项生理功能，对于菌体的生长繁殖、环境适应能力、致

病性及耐药性等多个方面具有重要意义。对于病原微生物来说，如何完成侵袭、致病过程以及如何适应宿主环境是首要面对的两个重要问题。外膜蛋白处于菌体的最外层，在这两方面都具有重要的作用。对OMPs的研究不仅有助于我们加深对细菌生命机理的了解，也有助于对微生物的利用及防治，尤其是对于许多病原微生物来说，对其OMPs的研究将有助于疫苗的开发及药物靶点发现。

近年来OMPs 与细菌致病机理和免疫机理的研究取得了很大进展。对OMPs结构和功能的了解将有助于揭示OMPs 诱发保护反应的机制以及OMPs 在诱发免疫应答时与免疫细胞的相互作用奠定基础。McAtee等采用蛋白质组学中生物信息学扫描、单向及双向电泳、免疫检测，再结合质谱鉴定分别对*Haemophilus influenzae* Rd及*Helicobacter pylori* 基因组的外膜蛋白及其免疫原性进行了分析^[39]；Rahman等在对goldfish的研究中发现*Aeromonas hydrophila* 的外膜蛋白能够激发宿主的免疫保护性，另外他们在研究中发现 *Flavobacterium psychrophilum* 的外膜组分同样也具有免疫保护性^[40]。本实验室的陈子珺^[41]等通过免疫蛋白质组技术分析了嗜水气单胞菌（*Aeromonas hydrophila*）的外膜蛋白双向图谱，发现了8个与免疫原性相关的蛋白，经过质谱的鉴定，其中除了1个外膜蛋白以外还有3个同处与外膜上的鞭毛蛋白及其他蛋白，提示这些蛋白可以做为疫苗的候选物。我国学者彭宣宪^[42]等还将*Shigella flexneri* 2a抗血清分别与外膜蛋白和可溶性蛋白2-DE胶转染的NC膜进行Western blotting，结果显示有13个免疫原性蛋白，外膜蛋白为7个，可溶性蛋白有6个，经过质谱鉴定，其中12个是新的免疫原性蛋白。

1.4 蛋白质相互作用

细胞接受外源或是内源的信号，通过其特有的信号途径，调节其基因的表达，以保持其生物学特性。在这个过程中，蛋白质占有很重要的地位，它可以调控，介导细胞的许多生物学活性。虽然有一些蛋白质可以以单体的形式发挥作用，但是大部分的蛋白质都是和伴侣分子一起作用或是与其他蛋白质形成复合体来发挥作用的^[43]。因此，为了更好地理解细胞的生物学活性，必须很好地理解蛋白质单体和复合体的功能，这就会涉及到蛋白质相互作用的研究。在现代分子生物学中，蛋白质相互作用的研究占有非常重要的地位。

研究蛋白质相互作用时要根据不同的实验目的及条件选择不同的实施策略。研

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库